

UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG
DER ARTSPEZIFITÄT
VON NAHRUNGSMITTELEIWEISS
IM MAGENINHALT

Peer Rosenkranz

Dess
München
1904

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Direktor: Prof. W. Spann

UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER ARTSPEZIFITÄT
VON NAHRUNGSMITTELEIWEISS IM MAGENINHALT

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peer Rosenkranz

aus

Getinge

Jahr

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Spann

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 5. 1984

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

An dieser Stelle sei es mir gestattet,
Herrn Professor Dr. med. H. D. Tröger
für die Überlassung des Themas und für
die Überprüfung und Betreuung während
der Ausarbeitung meinen herzlichsten
Dank auszusprechen. Ebenso möchte ich
mich bei Herrn Professor Dr. med. W.
Spann und ganz besonders bei Frau
Dr. med. E. Tutsch-Bauer für die Unter-
stützung beim Beenden der Arbeit herz-
lichst bedanken.

I	INHALTSÜBERSICHT
II	EINLEITUNG
III	THEORIE
	1 Serologische Grundbegriffe
	2 Diffusion
	3 Gele
	4 Immunodiffusion
	5 Die radiale doppelte Immunodiffusion
IV	MATERIAL UND METHODEN
	1 Untersuchungsmaterial
	2 Agargel-Aufbereitung
	3 Untersuchungsgang
	4 Antiseren
	5 Protokollschema
V	ERGEBNISSE
VI	DISKUSSION
VII	ZUSAMMENFASSUNG
VIII	LITERATURVERZEICHNIS
IX	LEBENS LAUF

II EINLEITUNG

Sowohl zur Todeszeitbestimmung als auch um Aussagen über die Zusammensetzung der letzten Nahrung treffen zu können und um somit Hinweise zur Identifikation von Leichen machen zu können, ist die Kenntnis der Zusammensetzung des Mageninhaltes oft von entscheidender Bedeutung in der Rechtsmedizin. (11) Der Nachweis der letzten Mahlzeit und ihrer Inhaltskomponenten sowie der Füllungszustand des Magens können bei Todesfällen mit unklarer Ursache wichtige Hilfe zur Aufklärung und bei Mordfällen hinweisend zur Täterermittlung sein. (14) (21)

Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Erwachsenen mit Resten einer Mischkost, bis zu dreizehn Stunden vor dem Tod, bei Kohlehydratnahrung, bis zu sechs Stunden vor dem Tod, sowie bei Säuglingen, bis zu sechs Stunden vor dem Tod, eine entsprechende Nahrung zu sich genommen wurde. Bei leerem Magen hat der Erwachsene mindestens drei Stunden vor dem Tod keine Mischkost und 45 Minuten vor dem Tod keine Kohlehydratnahrung zu sich genommen. Beim Säugling rechnet man entsprechend mit einem Mindestzeitraum von zwei Stunden vor dem Tod. (4) Diese Angaben beziehen sich auf Fälle plötzlichen, unerwarteten Todesgeschehens. Die Beurteilung wird komplizierter, wenn Medikamenteneinnahme, psychische Insulte, Hirntraumen sowie andere lokale Traumen und Veränderungen zum

Gesamtbild gehören. Diese Faktoren müssen mit in die Begutachtung einbezogen werden, da sie die intravitale Magenfunktion erheblich beeinträchtigen können. (21)

Zur qualitativen Bestimmung des Mageninhaltes hat Holszabek eine Methode entwickelt. Er durchwäscht den Gesamtmageninhalt mit Wasser in einem Plastiksieb. Die flüssigen Anteile des Mageninhaltes werden aufgefangen und chemisch, die korpuskulären Anteile makroskopisch und mikroskopisch untersucht. (36) Dadurch lassen sich pflanzliche und tierische Bestandteile relativ leicht - sowohl mit dem freien Auge als auch unter dem Mikroskop - nachweisen. Die artspezifische Differenzierung der Nahrungsbestandteile aus dem Mageninhalt gelingt bis heute nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob mittels einer einfach durchzuführenden, serologischen Methode Aussagen über die Artspezifität genossener Eiweissarten möglich sind.

Im Jahre 1890 entdeckte Behring spezifische Antitoxine im Blutserum von Tieren, welche mit Diphtheriegift vorbehandelt worden waren. Von nun an begann die moderne Serumforschung. Es folgten darauf weitere Entdeckungen von Antitoxinen und ihren Wirkungen. Bordet beobachtete 1899 das Auftreten von Hämolysinen und Hämagglutininen im Serum, nachdem defibriniertes Blut dem Versuchstier

injiziert worden war. Er entdeckte auch die Präzipitine, die das Kasein der Kuhmilch ausfällen, nachdem das Serum im Versuchskaninchen mit Kuhmilch behandelt worden ist. (39) Paul Uhlenhuth konnte im Jahre 1900 das Eiklar vom Eigelb mittels der von ihm entwickelten serologischen Methode unterscheiden. (34) Er wies sehr frühzeitig als erster auf die Bedeutung der serologischen Untersuchungsmethoden für die Nahrungsmittelchemie hin und befasste sich u.a. auch mit der serologischen Identifikation von tierischen Proteinen wie z.B. bei Fleischuntersuchungen. (40) Jedoch waren die Ergebnisse oft sehr unklar.

Die Weiterentwicklung der serologischen Methoden zur Proteinuntersuchung führte dazu, dass diese serologischen Untersuchungsverfahren heute ihren festen Platz in der Lebensmittelchemie haben. Mit dem Immunodiffusionsverfahren nach Ouchterlony konnten Milcheiweisszusätze in Wurst- und Fleischwaren nachgewiesen werden. (16) Im Jahre 1977 wurde in den Niederlanden eine Vergleichsstudie zu Nachweisuntersuchungen von Kasein und Sojaprotein in Fleischprodukten - einerseits mit Hilfe der Elektrophoresemethode nach Olsman und andererseits der Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony - durchgeführt. (6) Es stellte sich heraus, dass die Methode nach Ouchterlony - vorausgesetzt, dass das Probenmaterial nicht übermässig erhitzt worden war -

wesentlich grössere Genauigkeit gewährleistet. Die Autoren Beljaars und Olsman empfehlen jedoch eine Kombination beider Methoden. Baudner (3) bezeichnet die Methode nach Ouchterlony als die weitest verbreitete, und Heimann (13) betont die einzigartige Bedeutung dieses Verfahrens, sowohl für die Lebensmittelchemie als auch für die gerichtliche Medizin. Die Differenzierung tierischer und pflanzlicher Proteine ist mit Hilfe von nur rein chemischen Methoden heute nicht möglich. Wenn man auch bedenkt, dass mikroskopische Unterschiede der Muskulatur zwar bei den Krustentieren festzustellen sind, jedoch nicht bei den Säugern, wird die Bedeutung der Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony in diesem Zusammenhang zusätzlich unterstrichen. (10)

Am Anfang dieses Jahrhunderts beobachtete Bechhold (5), dass Antigen-Antikörper-Reaktionen auch in einem halbfesten Trägermedium - wie Gelatinegel - sich abspielen, und dass sich unter bestimmten Versuchsbedingungen Präzipitate in diesem Gel ausbilden können. Es waren einfache, lineare Immuno-Diffusions-Untersuchungen, wobei in mit Gel vermengtes Kaninchen-Immunserum als Antigen Ziegenserum diffundierte und dabei Präzipitationszonen entstanden. Anhand einer einfachen Diffusionsreaktion - wobei mit Agar vermengtes Kaninchenserum und verschiedene Schweineseren bzw. Ovalbumin verwendet wurden - bestätigten Reiner und Kopp im Jahre 1927,

dass multiple Präzipitatbildung auch bei Verwendung lipoidfreier Antigene festgestellt werden konnte. (29)

Oudin konnte mit der Entwicklung seiner eindimensionalen, einfachen Diffusionstechnik, der sogenannten Oudin Tube Technik, zeigen, dass sich ein Präzipitat bildet, wenn ein spezifisches Antigen mit dem korrespondierenden Antikörper reagiert. (27) Die grundlegenden Gesetze der Immunodiffusion wurden dadurch folgendermassen zusammengefasst:

- 1.) Es gibt einfache und doppelte Immuno-Diffusions-Untersuchungen.
- 2.) Die Anzahl der Präzipitationszonen unterrichtet über die Mindestanzahl der reagierenden Antigen-Antikörper-Systeme.
- 3.) Künstliche Mischungen von Antigen-Antikörper-Systemen ergeben diesselbe Reaktion wie die gesonderten Untersuchungen der Komponenten.
- 4.) Lage und Charakter des Präzipitats sind Funktionen der Reaktionskonzentration.
- 5.) Die Immunodiffusionsmethoden eignen sich auch zur Identifizierung der Antigene.

Im Jahre 1948 entwickelten Ouchterlony (25) und Elek (9) die sogenannte zweidimensionale Diffusionstechnik, heute auch als Ouchterlony-Verfahren bekannt. Vor allem zur Klärung der methodologischen und theoretischen Fragen

der linearen und radialen Doppeldiffusionsmethoden trugen die Arbeiten von Ouchterlony bei.

Mit den vorliegenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob auch mit den uns heute zur Verfügung stehenden Methoden eine Feststellung der Artspezifität genossener Proteine möglich ist. Dazu wurde die Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony ausgewählt, da sie leicht zu handhaben ist und mit einem relativ geringen Arbeitsaufwand verbunden ist. Die Methode bietet Möglichkeiten zu raschen und beliebig vielen Reproduktionen der Versuche. Sie gehört zu den häufigsten Methoden innerhalb der Lebensmittelchemie, insbesondere wenn es darum geht, die Art von Proteinen aufzudecken. Zudem hat diese Technik auch ihren festen Platz in der forensischen Medizin.

Zu diesem Zwecke wurden bei 30 Obduktionen, die im Institut für Rechtsmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt wurden - nachdem unter Sicht des Auges zwischen tierischen und anderen Bestandteilen differenziert worden war - Proben aus dem Mageninhalt entnommen und untersucht. Es wurden nur Proben entnommen, wenn man mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen konnte, dass es sich einerseits um Wurst- und Eireste sowie andererseits um Fleischteilchen handelte. Um eine Vergleichsmöglichkeit zu gewährleisten,

wurden zusätzlich Versuchsansätze mit rohem und gekochtem Fleisch aus dem Handel gemacht.

III THEORIE

1 Serologische Grundbegriffe

Die zwei entscheidenden Substanzen in der Serologie sind die Antikörper und die Antigene. Im menschlichen Organismus werden die Antikörper von den Plasmazellen gebildet als spezifische Reaktion körperfremder Moleküle, molekularer Systeme oder Zellen. Das menschliche Immunsystem kann schätzungsweise auf etwa eine Million verschiedene, derartige Antigene mit der Bildung von Antikörpern reagieren. Antigene und Antikörper lassen sich nur aufgrund ihrer Wechselwirkung erkennen. Nur mit Antikörpern lässt sich Antigenität, bzw. nur mit Antigenen Antikörperwirkung feststellen.

Ein Antigen ist eine körperfremde Substanz, die nach parenteraler Aufnahme in den Organismus die Bildung von Antikörpern auslöst und mit ihnen reagieren kann. Als Antigene können Proteine, Nucleinsäuren, Polysaccharide und Oberflächenstrukturen von z.B. Bakterien, Viren, Pflanzen und Staubteilchen wirken. Bei den Antigenen werden Vollantigene und Haptene unterschieden. Das Molekulargewicht der Haptene unterschreitet 2000. Sie

können ausserdem keine Antikörperproduktion in Gang setzen, binden jedoch die Antikörper ähnlich wie die Vollantigene. Wenn ein Hapten kovalent an ein Trägerprotein geknüpft ist, kann es antigen wirken. Dann ist ein Vollantigen entstanden. Ausser den künstlich erzeugten Antigenen muss man sowohl biologische Flüssigkeiten - wie Seren - als auch Zell- und Gewebsextrakte gewöhnlich als ein Gemisch von Antigenen sehen. Die Antigenität der menschlichen Erythrozyten wird durch mehrere Faktoren verschiedener Systeme bestimmt. Schliesslich muss man künstliche und natürliche Antigene unterscheiden. Ein Teil der natürlichen Antigene sind korpuskularer Natur und werden unter Antikörperwirkung entweder agglutiniert oder lösen sich in Anwesenheit von Komplement. Gelöste Antigene dagegen werden präzipitiert.

Die Antikörper sind Proteinmoleküle, die zwei wesentliche Funktionen besitzen. Zum einen erkennen und binden sie Antigene, zum anderen aktivieren sie nach der Bindung der Antigene die körpereigenen Abwehrmechanismen. Da die Proteine mit Antikörpereigenschaften im Blut des Menschen hauptsächlich in der Gamma-Globulinfraktion nachweisbar sind, werden sie als Immunglobuline bezeichnet. Die Spezifität eines Antikörpers wird meistens durch das jeweilige Antigen gekennzeichnet (Anti-A-

Hämagglutinine, Anti-Ovalbumin, Diphtherie-Antitoxin). Im Unterschied zu den Antigenmolekülen, wo verschiedene Epitope mehrmals am Molekül vorkommen können, wirken die einzelnen Antikörper praktisch immer nur auf eine Art von Epitopen. Ein Antigen mit den fünf Epitopen K, L, M, N und O ruft fünf verschiedene Antikörpertypen hervor. Diese haben dann die Spezifität anti-K, anti-L, anti-M, anti-N und anti-O. Dieses Antikörpergemisch kann dann mit entsprechenden Trennungsv erfahren in die einzelnen Typen aufgeschlüsselt werden. Antikörper mit zweifacher Spezifität entstehen selten in vivo. Die Antikörper sind meistens bivalent und vermögen zwei Epitope von gleicher Spezifität zu binden, im Unterschied zum Antigenmolekül, welches mehrere Antikörpermoleküle an sich binden kann. Das Immunglobulin G gilt als Prototyp der Antikörper, anhand dessen man den Aufbau des Antikörpermoleküls gut erklären kann.

Das Antikörpermolekül besteht aus vier Proteinketten, deren Untereinheiten durch nichtkovalente Bindungen und Disulfidbrücken zusammengehalten werden. (Abb. 1) Nach Lösung dieser Bindungen erhält man zwei Kettenpaare, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte als schwere (heavy oder H) und leichte (light oder L) Ketten bezeichnet werden. (Abb. 2) Die H-Ketten bestehen aus etwa 400 Aminoacylresten und haben

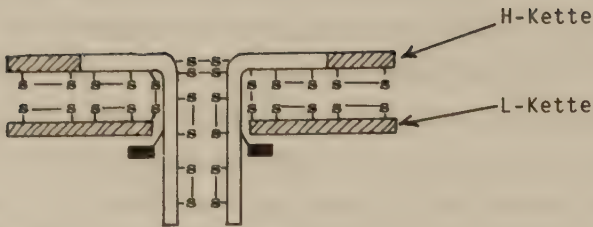


Abb. 1

Die Ketten sind über nichtkovalente Bindungen sowie drei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Auch innerhalb einer Kette werden jeweils innerhalb einer Homologieregion Disulfidbrücken ausgebildet.

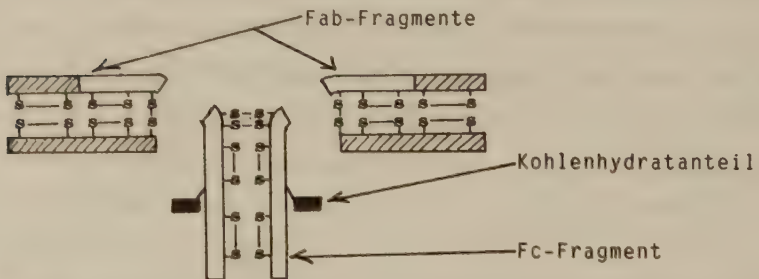


Abb. 2

Nach proteolytischer Spaltung entstehen zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Das schwarze Rechteck zeigt den Kohlenhydratanteil. Die gerasterten Bereiche sind variabel und bestimmen die Spezifität der Antigen-bindenden Stelle.

eine variable und eine konstante Hälfte. Die L-Ketten enthalten um die 200 Aminosäuren und bestehen ebenfalls aus einer variablen, aminoterminalen und einer konstanten, carboxyterminalen Hälfte. Unterzieht man den Antikörper einer proteolytischen Spaltung, so entstehen drei Bruchstücke; zwei Fab-Fragmente (Fab=Fragment, welches das Antigen bindet) und ein Fc-Fragment (c=cristallisierbar). Das Fc-Fragment ist ein Glykoprotein, das zwei jeweils verzweigte Ketten aus etwa neun Hexose-resten enthält. Dieser Teil bestimmt die Antikörperklasse, Halbwertszeit, Komplementfixierung und Placentapassage. Die wichtigste Funktion hier ist die Aktivierung der Abwehrmechanismen. Die Fab-Fragmente enthalten die Antigen-Bindungsstellen (antigene Determinanten) und sind frei schwenkbar als zwei Schenkel einer ypsilon-förmigen Gestalt des Gesamtmoleküls. Man nimmt an, dass die Grösse der antigenen Determinanten im Bereich von 15 bis 20 Aminosäureresten liegt. Dies scheint die wahrscheinlichste Anzahl zu sein, die die Bindungsstelle erfassen kann und damit die Spezifität bestimmt. Da das Molekül als Ganzes eine flexible Struktur besitzt, können sich die Bindungsstellen der Lage der Antigene bzw. ihrer Determinanten anpassen. Der Grad der Spezifität des Antikörpers wird durch diese Anpassungsfähigkeit bestimmt. (Abb. 3)

Die Antigen-Antikörper-Reaktion tritt auf, weil die

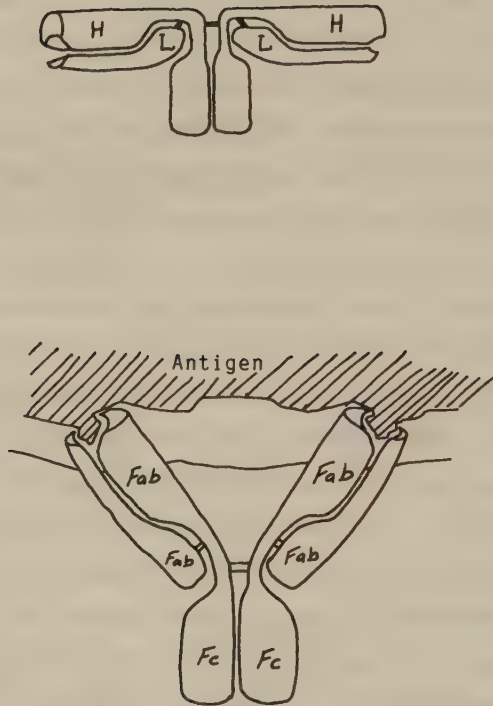


Abb. 3

Oben ein sogenanntes Ypsilon-Modell, welches die Flexibilität durch Drehbarkeit der Schenkel des Antikörpers demonstriert. (43) Unten dasselbe Modell in Verbindung mit einem Antigen.

Antikörper zwei Bindungsstellen haben, und die Antigene gewöhnlich mehrere antigene Determinanten besitzen. Aus diesem Grund entsteht beim Mischen von Antikörpern mit Antigenen eine dreidimensionale Gitterstruktur. Eine maximale Gitterbildung tritt in dem Bereich auf, in dem das Verhältnis der zwei Komponenten 1:1 ist. Beim Antigenüberschuss finden die Antikörper nur ein Antigen, mit dem sie sich verbinden. Eine Bindungsstelle bleibt frei. Beim umgekehrten Verhältnis bleibt ebenfalls die Gitterbildung aus, da die Antikörper unter sich um die zu wenigen, antigenen Determinanten konkurrieren. (18)

Bei der Antigen-Antikörper-Bindung ändert sich der physikalisch-chemische Zustand des Gemisches, welches unter Umständen dann für das bloße Auge sichtbar wird. Es entsteht z.B. ein sog. Agglutinat oder ein Präzipitat. Bei inkompletten Antikörpern (Haptene) bleibt diese makroskopisch feststellbare Veränderung aus. Die Antikörper werden oft nach der Reaktion, die sie auslösen, benannt. So spricht man von Agglutininen bei Antikörpern, die eine Agglutinationsreaktion hervorrufen. Analog dazu spricht man z.B. auch von Opsoninen, Hämolyسين, hämagglutinationshemmenden und präzipitierenden Antikörpern. Ein- und derselbe Antikörpertypus kann entsprechend der Reaktionsbedingung verschiedene Reaktionen hervorrufen.

Bei der direkten Agglutinationsreaktion reagieren die entsprechenden Antikörper mit Antigenen von korpuskularer Natur, die dann in der Reaktion zusammenballen. Nur wenn Antikörper diese spezifische Reaktionsart hervorrufen, spricht man von Agglutination, obwohl auch andere Faktoren und Umstände dieses Erscheinungsbild (z.B. Änderung des Versuchsmilieus) hervorrufen können. Komplette Agglutinine kommen auch in physiologischer Kochsalzlösung voll zur Geltung. Die inkompletten Agglutinine binden sich zwar auch unter solchen Verhältnissen an das Antigen, die Agglutinationswirkung jedoch bleibt aus. Der Nachweis der Bindung fordert dann besondere Verfahren. Enthält die Lösung Makromoleküle wie z.B. Albumine, Gelatine oder Dextrane, kommt die Agglutination schliesslich auch zustande. Wenn mit durch proteolytische Enzyme veränderten Erythrozyten oder mit der direkten Coombs-Reaktion gearbeitet wird, entsteht die Agglutination ebenfalls.

Wenn gelöste Antigene an die Oberfläche von Erythrozyten gebunden werden und die entsprechenden Antikörper dann erst eine Agglutination hervorrufen, so liegt eine indirekte oder passive Agglutinationsreaktion vor. Für diese Reaktionsart können auch solche homogene Suspensionen bildende Substanzen verwendet werden, die das zu prüfende Antigen gut adsorbieren.

Als Hämolysine bezeichnet man Antikörper, die in Anwesenheit von Komplement zur Auflösung von Erythrozyten führen. Man unterscheidet dabei Heterohämolysine, Isohämolysine und Autohämolysine, dem Ursprung der Antikörper entsprechend.

Die Opsonine haben die Eigenschaft, dass sie bei der Bindung an Zellen entsprechender Spezifität und in Anwesenheit von Komplement die Zellphagozytierung durch Leukozyten beträchtlich beschleunigen. Die Opsonine können gegen Bakterien, Erythrozyten und Leukozyten gerichtet sein, spielen aber in der forensischen Serologie kaum eine Rolle.

Einen wichtigen Antikörpertyp stellen die Antiglobuline dar. Die Reaktion kommt dadurch zustande, dass Zellen, an deren Oberfläche homologe, inkomplette Antikörper gebunden sind, agglutinieren, wenn sie mit einem Antiglobulinserum in Kontakt kommen. Wenn sich z.B. präzipitierende Antikörper an Antigene binden, welche vorher von Erythrozyten adsorbiert worden sind, kann man diese Antigen-Antikörper-Bindung mittels Antihumanglobuline (gegen menschliche Antikörper gerichtetes Antiserum) nachweisen. Es tritt eine Agglutination auf. Die nicht besonders empfindlichen Präzipitationsuntersuchungsmethoden erübrigen sich dadurch. Die Bindung humaner Antikörper wird am besten mit Kaninchen-, Ziegen- oder

Pferdeserum, welches mit menschlichem Serum oder menschlichen Globulinfraktionen hyperimmunisiert wurde, nachgewiesen. Aus dem gebildeten Antihuman-Globulin-Serum werden die gegen nichtsensibilisierte Erythrozyten gerichteten Heteroagglutinine durch Absorption entfernt. Die Antiglobulinreaktion ist die Grundlage des serologisch vielverwendeten Coombs-Tests. Bei der Gc- und Gm-Serumgruppenidentifikation wird sie auch verwendet.

Wenn Antikörper mit gelösten Antigenen einen feinflockigen Niederschlag erzeugen, spricht man von einer Präzipitationsreaktion. Das Präzipitat besteht aus einer Antigen-Antikörper-Gitterstruktur. Voraussetzung ist allerdings, dass die Reaktionspartner im äquivalenten Mengenverhältnis vorliegen. Im sog. Alpha- oder Beta-Verfahren wird dies durch quantitative Untersuchungen festgestellt. Das Alpha-Verfahren beinhaltet, dass gleiche Mengen Immunserum mit verschiedenen Verdünnungen der Antigenlösung zusammengebracht werden, im Unterschied zum Beta-Verfahren, wo zu einer Verdünnungsreihe des Immunserums immer konstante Antigenkonzentrationen gegeben werden. In dem Ansatz, wo die Präzipitation am schnellsten stattfindet, liegt das optimale Mengenverhältnis vor. Die Untersuchungen auf Präzipitine erfolgen entweder mit serologischen Röhrchen im flüssigen Medium oder im Gel durch Diffusionstechniken. (1)

2 Diffusion

Die Moleküle oder Ionen gelöster Substanzen bewegen sich aufgrund der Molekularbewegung frei im Lösungsmittel und streben immer nach einer gleichmässigen Verteilung innerhalb des gegebenen Raumes. Kommt eine Lösung mit darin gelöster Substanz in Berührung mit einem Lösungsmittel ohne diese Substanz, so streben die einzelnen Substanz-Moleküle immer mehr ins Lösungsmittel hinein, um sich im Gesamtraum gleichmässig zu verteilen. Diesen Vorgang nennt man Diffusion. Man könnte die Gesetzmässigkeiten der Diffusion gelöster Substanzen laut nachfolgendem Modell erklären:

Man stelle sich einen unendlich langen Zylinder (Abb. 4) vor, in dem sich an einer scharfen Grenzfläche (G) eine Substanzlösung (S) mit einem Lösungsmittel (L) (z.B. destilliertes Wasser) treffen. Zu Beginn beträgt die Teilchenkonzentration der Substanzlösung (C) 100%. Durch die Diffusion ändert sich aber diese Konzentration. In unendlichem Abstand von der Grenzfläche G ist sie immer noch 100%, gegen G fällt sie allmählich ab, um genau an der Grenzfläche 50% zu sein. Mit weiterer Entfernung von G fällt die Konzentration noch mehr ab, um sich in unendlicher Entfernung dem Wert Null anzugleichen. (Abb. 5)

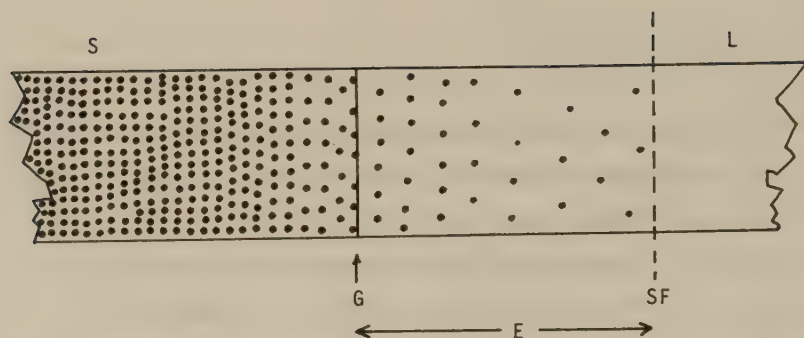


Abb. 4

Diffusion der Substanz S in das Lösungsmittel L hinein (Diffusionsrichtung von links nach rechts) im unendlich langen Rohr. G =Grenzfläche zu Beginn der Diffusion (Zeitpunkt Null), SF =beliebig gewählte Schnittfläche, E =Abstand von G zu SF

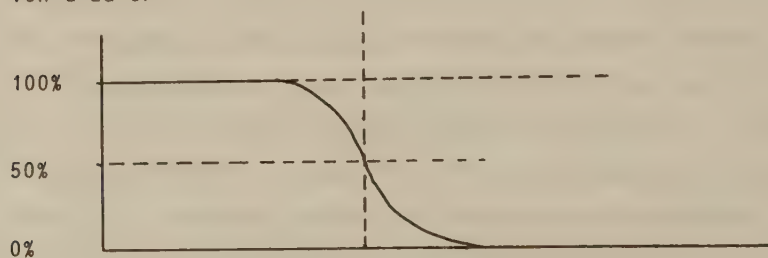


Abb. 5

Schematische Darstellung der Konzentrationsänderung der Substanz S bei Diffusion gemäss Abb. 4, bezogen auf die Ausgangskonzentration 100%.

Die an einer beliebigen Schnittfläche (SF) im Lösungsmittelzylinder, mit der Entfernung E von der Grenzfläche G, gemessene Konzentration der Teilchen (C_E) ist von der Zeit T abhängig. Die Zeit T bezeichnet den Zeitraum ab dem Moment, wo die Substanzlösung S mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommt (und die Diffusion infolgedessen einsetzt) bis zu einem danach liegenden, beliebig gewählten Zeitpunkt. C_E wird umso grösser desto mehr Zeit verstrichen ist. Weiterhin kann man mathematisch zeigen, dass die Konzentration C an der Grenzfläche G (C_G), unabhängig von der Zeit, immer 50% von der Ausgangskonzentration beträgt. Ebenso kann man zeigen, dass der Abstand E von der Grenzfläche G in einem linearen Verhältnis zur Quadratwurzel der Zeit T steht: $E = K \sqrt{T}$ (K bezeichnet dabei eine Konstante.) Wenn bei der Zeit T die Konzentration C_E im Abstand E von der Grenzfläche G gemessen wird, so wird dieselbe Konzentration nach der Zeit 4T im Abstand 2E gemessen werden. Schliesslich ist die Diffusion -wie Albert Einstein festgestellt hat- (zit. Backhausz) (1) von der Diffusionskonstante D abhängig, die wiederum von der Temperatur, Viskosität des Mediums und von dem Radius r des Diffusionsmoleküls bestimmt wird:

$$D = \frac{R}{6 \pi N} \frac{T}{\eta r}$$

R=Gaskonstante, N=Avogadro'sche Zahl, T=absolute Temperatur, η =Viskosität des Mediums, r=Radius des diffundierenden Moleküls. Hieraus ist leicht ersichtlich, dass je

kleiner der Molekülradius, je geringer die Viskosität und je höher die Temperatur, desto grösser ist die Diffusionsgeschwindigkeit, mit der sich die Substanz S von der Grenzfläche entfernt.

Letzlich kann man zusammenfassend feststellen, dass die Anfangskonzentration (C_0), die Zeit (T) und der Diffusionskoeffizient (D) diejenigen Faktoren sind, die massgebend bestimmen, wie sich die Konzentration als Folge der Diffusion ändert. Steigt die Temperatur z.B. um 10° , so erhöht sich nach Schätzung Höbers (zit. Backhausz) (1) der Betrag des Diffusionskoeffizienten um zirka 25%.

3 Gele

Die Immundiffusion findet in Gelen statt, denen allen gemeinsam ist, dass sie Kolloidsysteme sind. Die Kolloids substanz geht infolge hoher Viskosität nicht in Lösung, sondern bildet ein netzartiges Gerüst im Dispersionsmedium. Nur Gele, die kristallklar oder transparent sind, eignen sich als Trägermedien bei der Immundiffusion. Folgende Faktoren beeinflussen die Diffusion gelöster Substanzen in Gelen:

- 1.) Struktur des Gels, vorwiegend die Porengrösse im netzartigen Gerüst.

- 2.) Form und Grösse der diffundierenden Substanzmoleküle.
- 3.) Konzentration der festen Gelsubstanz.
- 4.) Viskosität des Lösungsmittels im Gel.

Man muss sich vor Augen halten, dass die Diffusion ins flüssige Element des Gels um so mehr den Verhältnissen der freien Diffusion gleichen, je grösser die Poren, je kleiner die diffundierenden Moleküle sind, je mehr sie Kugeln ähneln und je niedriger die Konzentration der festen Gelsubstanz ist. Die Verhältnisse weichen aber dann wesentlich von denen der freien Diffusion ab, wenn sich die diffundierenden Moleküle infolge Adsorption oder einer chemischen Reaktion an die feste Substanz des Gels binden. Folgende Geltypen sind heute gebräuchlich:

Agar: Die Gelidium- und Gracilaria-Arten der roten Meeresalgen bilden das Rohmaterial zur Herstellung von Agar. Nach verschiedenen Reinigungsvorgängen entsteht das zur Immunodiffusion gebräuchlichste Agar. Handelsübliche Präparate sind: Difco-Bacto Agar, Difco Spezial Agar (Noble), Oxo Ion Agar, Behringwerke Reinagar und New Zealand Davis Agar. Die Qualität dieser Präparate ist durchaus gut akzeptabel. Nur ausnahmsweise sind Hochreinigungsmethoden zusätzlich notwendig. Dabei sollten die Verfahren, die mit wiederholtem Schmelzen verbunden sind, besser vermieden werden, da man leicht das Risiko eingeht, Veränderungen im Agar-

Molekularbereich hervorzurufen, welche wiederum die Diffusionsvorgänge erheblich stören können. Der Agar setzt sich aus Ketten von mehreren hundert Galaktoseradikalen zusammen, wobei Agarose und Agaropektin die zwei Hauptkomponenten ausmachen. Gewisse Makromoleküle binden sich an das Gel, vor allem an die polaren Gruppen des Agaropektins. Die Diffusion wird damit stark beeinflusst, wie es z.B. bei der Phosphoproteinphosphatase, beim Fibrinogen oder bei anderen Lipoproteiden der Fall ist. In solchen Fällen ist es ratsam, das Agarosegel zu verwenden. Weiterhin wird die Verwendbarkeit in gewisser Masse eingeschränkt, weil Mikroorganismen, u.a. aus den Familien Actinomyces, Dytophaga und Pseudomonas, agarabbauende Enzyme, insbesondere Agarase, erzeugen. Agar kann auch als Hapten funktionieren und dadurch die Produktion spezifischer Antikörper in Gang setzen, wenn Bindung an ein Vollantigen erfolgt.

Gelatine: Wenn man Kollagen mit Wasser auskocht, entsteht Gelatine. Die 2%ige oder höher konzentrierte Gelatinelösung erstarrt beim Erkalten zum Gel und hat sich bei Diffusionsuntersuchungen einen Platz errungen. Jedoch wird die Verwendbarkeit durch einige Umstände eingeschränkt. Bei einer Temperatur von schon +35°C oder mehr verflüssigt sich das Gelatinegel. Bei der Immunodiffusion reagieren die spezifischen Antikörper mit Gelatine und gewisse proteolytische Enzyme depoly-

merisieren das Gel, und eine Verflüssigungsreaktion tritt ein.

Pektin: Dies ist ein lineares Makromolekül und Bestandteil der interzellulären Substanz von Pflanzen. Das Molekül besteht aus den zwei Komponenten Pektinsäure und Araban. Das Pektingel hat den Vorteil, dass seine Herstellung und Lösung bei Zimmertemperatur erfolgen kann und ausserdem sein Gehalt an Trockensubstanz niedrig ist. Dieser Geltyp eignet sich gut bei Untersuchungen mit thermolabilen Antigenen. Nachteilig ist die Instabilität durch enzymatische Spaltung.

Celluloseacetat: Dieses Gel findet meistens als elastische Platten Verwendung. Vorteilhaft ist, dass auch grosse Moleküle hierin diffundieren können. Das mit Wasser benetzbare Gel wird kristallklar, wenn man es in Öl taucht. Als Nachteil gilt, dass eine Präzipitatabildung nicht beobachtet werden kann.

Polyacrylamid: Ein 3- bis 5%iges, elastisches und in Wasser unlösliches Gel, welches vorwiegend bei elektrophoretischen Untersuchungen eingesetzt wird. Es ist transparent, farblos und sehr stabil.

Silikat: Das aus Natriumsilikat gewonnene Gel ist sehr brüchig und hat sehr kleine Poren. Deswegen ist es für Immunodiffusionsuntersuchungen ungeeignet.

Stärke: Aus hydrolysierten Stärkekörnchen entstehen die gelbildenden Fragmente. Das Stärkegel ist stark opalisierend und kommt vorwiegend bei der analytischen Elektrophorese zur Anwendung. (1)

4 Immunodiffusion

Die Immunodiffusionsreaktion enthält Antigen-Antikörper-Systeme, die durch Diffusion im Gel spezifische Präzipitate hervorrufen. Diese bilden sich zwar im flüssigen Gelelement, jedoch verhindert das Gelgerüst, dass sie z.B. durch mechanische Wirkung verlagert werden. Man beurteilt die Ergebnisse aufgrund der Lage der Präzipitate. Im Unterschied zur freien Diffusion wird die Immunodiffusion eingeschränkt, wenn Moleküle mit dem entsprechenden immunologischen Reagenz zusammentreffen. Bei geeigneten Konzentrationsverhältnissen entsteht ein Präzipitat. Die Einteilung der Immunodiffusionsmethoden geschieht entweder nach der Anzahl oder Ausgangslage und Diffusionsbewegung der Reagenzien.

Wenn eine einzige Antigenart mit dem entsprechenden Antikörper reagiert, spricht man von einem einpaarigen oder simplexen System. Das gleiche gilt, wenn ein Antigen mit mehreren verschiedenen Epitopen, mit einer Art von Paratopen der Antikörper reagiert. Ein allgemeingültiges, immunologisches Gesetz besagt, dass Paratope von verschiedener Spezifität sich jeweils an verschiedenen Antikörpern befinden, während verschiedene Epitope mitunter an ein- und demselben Antigenmolekül angetroffen werden können. Wenn z.B. das Antigen A mit dem Antikörper Anti-A reagiert, kommt es

zur Ausbildung von einer einzigen Präzipitationslinie.

Anders ist es beim komplexen System. Hier reagieren verschiedene Antigene von untereinander verwandter Spezifität mit einem Antikörpermisch. Das ist der Fall, wenn die beiden Antigene A und B mit dem Gemisch von Anti-A und Anti-B reagieren.

Von multiplen Systemen spricht man, wenn simplexe und komplexe Systeme gleichzeitig reagieren. (Abb. 6) Der besondere Vorteil der Immunodiffusionsmethoden ist, dass die ein multiples System bildenden simplexen und komplexen Präzipitationssysteme dieselben Reaktionen geben, wie bei ihrer gesonderten Untersuchung. Die Zahl der Präzipitationslinien entspricht der Mindestzahl reagierender Antigen-Antikörpersysteme. Teilt man jedoch die Immunodiffusionsmethoden nach der Lage der Reagenzien ein, ergeben sich fünf wichtige Typen. Bei der einfachen Immunodiffusion kommen Antigenlösung und Immunserum direkt miteinander in Kontakt. Dabei ist eins der beiden im Gel enthalten und mit diesem vermischt. Gewöhnlich befindet sich das Immunserum im Gel, und die Antigene diffundieren in dieses hinein. Die Gesetze der freien Diffusion treffen hier in diesem Fall nicht zu, da die Moleküle sich sofort nach Überschreiten der Grenzschicht mit den entsprechenden

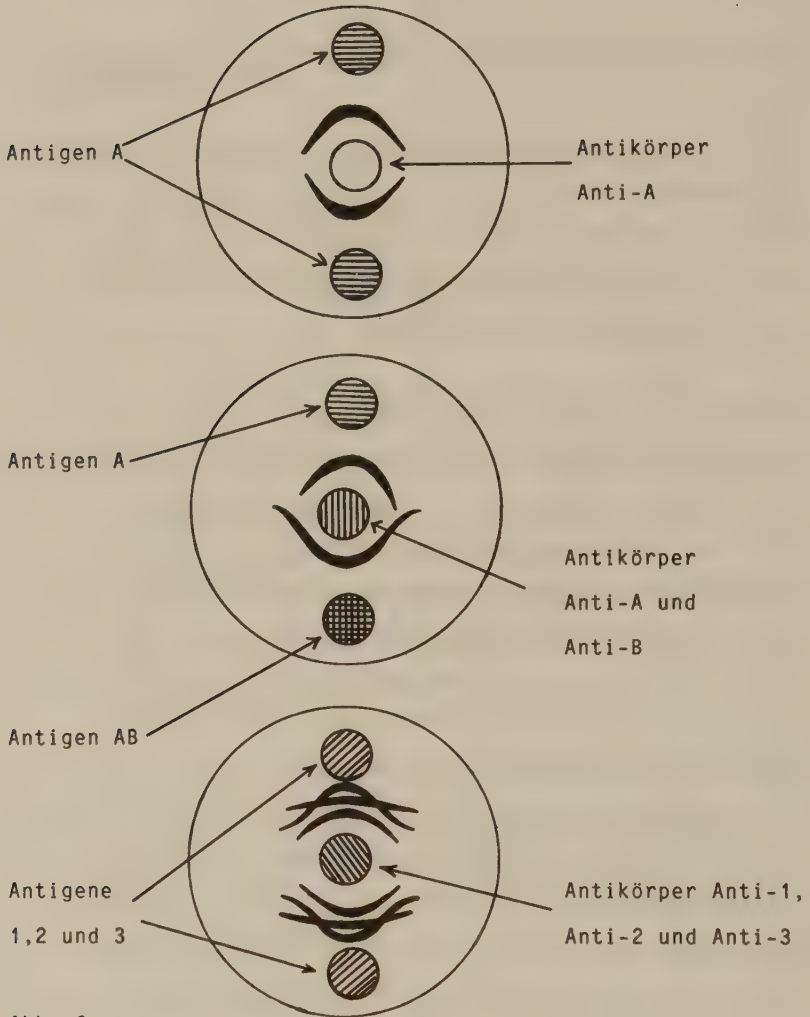


Abb. 6

Oben: Simplexes System, Mitte: Komplexes System,

Unten: Multiples System

Reagenzien verbinden.

Die doppelte Immunodiffusion beinhaltet, dass Antigene und Antikörper aus zwei verschiedenen Richtungen ins Gel hinein, aufeinander zu diffundieren. Das Gel enthält bei Anfang der Reaktion weder Antigene noch Antikörper. Die Untersuchung wird so vorgenommen, dass die Diffusion des Immunserums und die der Antigenlösung gleichzeitig in Gang kommen. Man spricht dabei von verzögerter, doppelter Immundiffusion, wenn einer der beiden Reaktionspartner seinen Diffusionsstart zu einem späteren Zeitpunkt hat als der andere.

Weiter unterscheidet man eine lineare Immunodiffusion von einer radialen. Bei der linearen diffundieren die immunologischen Reagenzien in eine Richtung, senkrecht zur Grenzfläche. Die lineare Immundiffusion lässt sich sowohl bei einfachen wie bei doppelten Immundiffusionen beobachten.

Die radiale Immundiffusion dagegen lässt ein oder beide Reagenzien radial von einem oder zwei Punkten aus diffundieren. Sie ist zweidimensional, egal ob sie einfach oder doppelt stattfindet. Man kann sie auch dreidimensional ansetzen, wird aber davon Abstand nehmen, da die Auswertung der Ergebnisse sehr schwer zu vollziehen ist. Die doppelte, radiale Immunodiffusions-

methode wurde von Ouchterlony (26) entwickelt und hat eine besondere Bedeutung in der Serologie bekommen.

Letztlich muss noch die Gruppe der komparativen Methoden genannt werden, bei denen zwei oder mehrere Antigen-Lösungen mit Hilfe eines Immunserums geprüft werden. Man kann auch genau umgekehrt vorgehen, wobei mittels nur einer einzigen Antigen-Lösung mehrere, verschiedene Immunseren untersucht werden. Diese Methodik hat besonders ihren Platz bei Ermittlungen, die Identität, Verwandtschaft und Unterschiedlichkeit von Antikörpern aufdecken sollen. (1)

Bei quantitativen Untersuchungen in der radialen Immundiffusion werden die entsprechenden Antigen- oder Antikörperkonzentrationen ermittelt, die gerade noch zur Bildung eines sichtbaren Präzipitats führen. Das Zentralloch wird mit dem entsprechenden Immunserum und die peripheren Löcher mit geometrischen Verdünnungen einer Antigenlösung gefüllt. Um das Zentralloch erscheinen Präzipitate als Identitätsreaktionen, solange die Antigenkonzentration zur Bildung eines sichtbaren Präzipitats ausreicht.

Bei der Polygonmethode werden verschiedene Antigenlösungskonzentrationen verglichen, um Aufschlüsse über eine unbekannte Lösungskonzentration erhalten zu können.

Der zentrale Behälter enthält immer dieselbe Immunserumkonzentration. Drum herum wird jedes zweite Loch mit einer Lösung bekannter Konzentration und die übrigen Löcher mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt. Beim Anlegen mehrerer, solcher Rosetten kann man die unbekannte Konzentration ermitteln, indem man die verschiedenen Präzipitationsmuster miteinander vergleicht. Es bilden sich mehr oder weniger regelmässige Polygone aus. Schwächere Lösungskonzentrationen bilden näher der Antigenlösung ihre Präzipitationslinien. Ist die Konzentration jedoch stärker, liegen die Linien weiterentfernt von den Antigenlösungsbehältern. Das ganze Verfahren kann auch umgedreht werden, indem man Antikörperlösungen mit verschiedenen Konzentrationen quantitativ untersucht.

5 Die radiale, doppelte Immunodiffusion

Bei der doppelten Immunodiffusion diffundieren die Reagenzien aus zwei verschiedenen Richtungen, um miteinander im Gel zu reagieren. Das Gel enthält ursprünglich keine Reagenzien. Die Lage der einzelnen Präzipitationszonen wird durch die relative Konzentration der entsprechenden Moleküle des Antigen-Antikörper-Systems, ihren Diffusionskoeffizienten und ihr Kombinationsvermögen bestimmt.

Die Methoden der radialen, doppelten Immunodiffusion

haben sich mit der Zeit weitgehend durchgesetzt, da dieser Untersuchungstyp technisch einfach durchzuführen ist, und die Ergebnisse sich schnell auswerten lassen. Vor allem bei der Ermittlung der Anzahl der Antigen-Antikörper-Systeme und beim Vergleich von Antigen- bzw. Antikörperlösungen hat sich die radiale, doppelte Immunodiffusion bewährt. Hierbei kann auch entsprechend aus den Angaben auf die Menge und den Diffusionskoeffizienten der Reagenzien geschlossen werden. Am einfachsten wird die Untersuchung durchgeführt, wenn man aus einer etwa 2 mm dicken Agarplatte zwei kreisrunde kleine Löcher aushebt. In das eine kommt die Antigenlösung und in das andere wird das Immunserum getan. Die beiden Reagenzien diffundieren radial ins Gel, und die Antigen-Antikörper-Reaktion führt gewöhnlich zur Bildung einer gekrümmten Präzipitationszone. Dabei wirken dieselben Faktoren bei multiplen und komplexen Systemen wie bei der linearen, doppelten Diffusion. Die Gesetzmässigkeiten der einfachen Systeme gelten im Grunde genommen auch für komplexe und multiple Systeme.

Der Reaktionsmechanismus lässt sich annähernd durch Anwendung eines Modells bestimmen, bei dem die Diffusion aus zwei punktförmigen Behältern erfolgt, welche verhältnismässig viel Reagenz enthalten (Abb. 7). Bei äquivalenten Reagenzproportionen entsteht das

Präzipitat genau an der Begegnungsstelle von Antigen und Antikörper. Sind die Proportionen nicht äquivalent, so bildet sich das Präzipitat mehr auf der Seite des schwächeren Reagenzes aus. Die Konzentration der Reagenzien im Gel erhöht sich im Laufe der Zeit durch fortlaufende Diffusion. Das hat zur Folge, dass das Präzipitat nach zwei Seiten wächst. Sind die Reaktionsproportionen der beiden Reagenzien äquivalent, hängt die Lage des Präzipitats nur von den Diffusionskonstanten ab. Beim Sonderfall, wo diese Konstante für Antigen und Antikörper gleich ist, bildet sich eine gerade Linie aus. Anderenfalls kann man aus dem Radius des Kreises auf die Diffusionskonstante schliessen. (41)

Da das Molekulargewicht des Antigens in der Regel grösser ist, als das des Antikörpers und damit die Diffusionskonstante entsprechend kleiner, wird das Präzipitat konvex zum Ausgangspunkt der Antikörper hin ausgebildet. (15) Liegen die Reagenzien in nicht äquivalenter Konzentration vor, so verändert die Leitkante des Präzipitats ihre Lage dahin, dass sie sich dem Behälter nähert, der das schwächere Reagenz enthält. Vorteilhaft ist auch bei der radialen Diffusion, dass unvermittelte Temperaturveränderungen das Ergebnis nicht beeinflussen. Wiederholtes Auffüllen der Behälter ändert kaum etwas am Ergebnis, so lange sich die Reagenzien in äquivalenter oder fast äquiva-

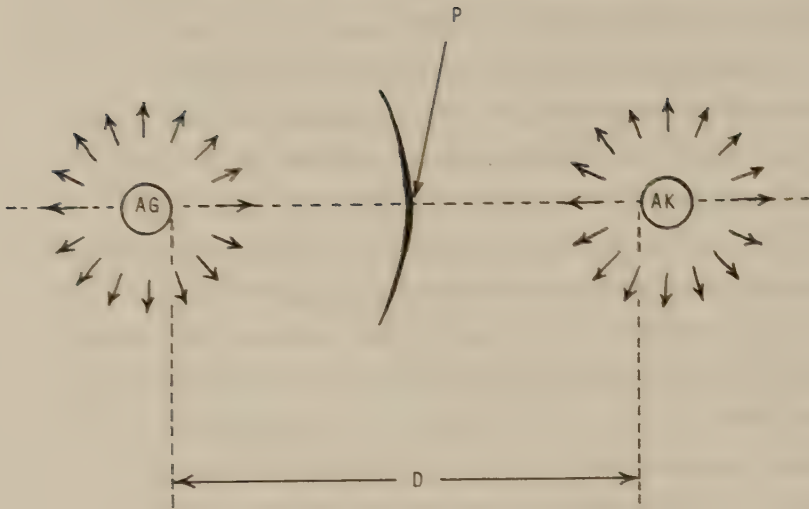


Abb. 7

Mechanismus der radialen Immunodiffusion: Aus den Behältern AG (Antigene) und AK (Antikörper) diffundieren die Antigen- und die Antikörpermoleküle radial aufeinander zu. Der Abstand der beiden Behälter ist D . Die Reagenzien treffen sich zum ersten Mal am Punkte P auf der gedachten Geraden, welche durch die beiden Mittelpunkte der Behälter zieht. Die Lage des Punktes P ist nur von den Diffusionskonstanten der beiden Moleküllösungen abhängig.

lenter Konzentration begegnen.

IV MATERIAL UND METHODEN

1 Untersuchungsmaterial

Bei insgesamt 30 im Institut für Rechtsmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführten Obduktionen wurde Material aus dem Mageninhalt entnommen. Dabei wurde unter Sicht des Auges festgestellt, dass es sich um Bestandteile tierischer Herkunft handelte, wie z.B. Fleisch- oder Wurstbestandteile. Das Material setzte sich wie folgt zusammen:

Gekochtes Ei	2 Fälle
Wurst, verschiedener Art	11 Fälle
Fleisch	17 Fälle

Ausserdem wurde Versuchsmaterial, welches nicht aus dem Sektionsgut entstammte, verwendet. Es handelte sich dabei um:

Rohes Schweinefleisch	3 Fälle
Gekochtes Schweinefleisch	3 Fälle
Rohes Rindfleisch	3 Fälle
Gekochtes Rindfleisch	3 Fälle

Die Proben, welche nicht dem Sektionsgut entstammten, wurden in 12 verschiedenen Fleischerläden gekauft. Die Hälfte der Proben wurde in siedendem Wasser 60 Minuten lang gekocht. Dabei handelte es sich um Stück-

chen, nicht grösser als 3 x 3 x 3 cm.

Das Untersuchungsmaterial wurde nach der Entnahme in entsprechend kleine Stückchen zerkleinert und im Reagenzglas mit Aqua dest. ausgewaschen, bis man trotz kräftigen Schüttelns mit dem blossen Auge keine Trübung mehr feststellen konnte. Nach Abtropfen auf Löschpapier wurde jeweils ein Gramm des zu untersuchenden Materials mit dem Skalpell fein zerkleinert und mit vier bzw. neun ml physiologischer Kochsalzlösung maschinell homogenisiert. Sieben Proben aus dem Sektionsgut sowie zwölf Proben, welche nicht dem Sektionsgut entstammten, wurden zusätzlich mit 5%iger Ammoniaklösung homogenisiert und zwar in zwei Verdünnungen, ein Gramm auf vier ml und ein Gramm auf neun ml.

Nach 24-stündiger Extraktion bei +4°C wurden die Proben abzentrifugiert. Vom Überstand erfolgten die Untersuchungen im Doppeldiffusionsverfahren nach Ouchterlony.

2 Agargelaufbereitung

In den Untersuchungen wurde Agargel nach der Zubereitung von Hirschfeld verwendet:

5 g Agar purum wurden in

250 ml Aqua dest. im Wasserbad gelöst. Nach etwa 5 Minuten wurde ein Gemisch aus

166 ml Stammlösung und
84 ml Aqua dest. dazugegeben. Bei etwa +80°C wurden
dann als Konservierungsmittel
50 mg Natrium-Azid hinzugefügt.

Die Stammlösung bestand aus Veronal-Puffer mit folgender
Zusammenstellung:

Veronal	4,98 g
Natrium-Veronal	51,53 g
Calcium-Lactat	4,60 g
Aqua dest. ad drei Liter.	

Das gelöste Agargel wurde in Mengen von 50 ml in kleine
Erlenmeyerkolben abgefüllt, luftdicht verschlossen
und bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Damit wurde
verhindert, dass das Agargel öfter als zweimal erhitzt
werden musste. Sonst treten Ionenveränderungen im
Agarfeingerüst bzw. Änderungen des Puffermilieus auf.

(1) Die Lagerungszeit betrug maximal 14 Tage. Bei
längerer Lagerungsdauer sind ebenfalls Strukturver-
änderungen des Agargels zu befürchten, die die Ergebnisse
fälschen können. (1)

3 Untersuchungsgang

Geräte: Kapillarpipetten, Glasschreiber, Objektträger,
Messpipetten, Erlenmeyerkolben, Bunsenbrenner, Wasserbad,
Wasserwaage, Tariergestell, Lochstanze.

Jeder Objektträger wurde mit Hilfe eines Glasschreibers mit einer römischen Ziffer und dem Versuchsdatum gekennzeichnet. Anschliessend wurden sie mit einem Alkohol-Äther-Gemisch (10:1) gesäubert und somit auch von Fettsuren befreit. Nach dem Trocknen wurden sie viermal kurz durch die nichtleuchtende Flamme des Bunsenbrenners geschwenkt, um Keimfreiheit zu erzielen. Durch dieses kurze Erhitzen wurde ausserdem noch erreicht, dass sich der anschliessend aufgegossene Agar gleichmässig und leicht über die ganze Oberfläche verteilte, ohne dass kleinste, ausgesparte, freie Fleckchen entstanden. Bei kalten Objektträgern gab es diesbezüglich Schwierigkeiten.

Der geschmolzene Agar wurde mittels einer ebenfalls kurz über der Bunsenbrennerflamme erwärmten Pipette auf die erhitzten Objektträger zu einer Schichtdicke von einem Millimeter aufgegossen. Nach den ersten Gelplattenzubereitungen ergab sich ein Verbrauch von 3,0 ml geschmolzenem Agargel. Vorher war ein Tariergestell mit einer Wasserwaage austariert worden und hierauf ruhten die Objektträger beim Gelplattengiessen. Somit war gewährleistet, dass die Objektträger horizontal auflagen und sich dadurch eine gleichmässige Agarschichtdicke spontan ausbilden konnte. Nach etwa drei bis fünf Minuten war der Agar erstarrt. Dann wurden mit einer speziellen Lochstanze die rosetten-

förmig angeordneten Serumbehälter ausgestanzt. (Abb. 8) Die Lochstanze besteht aus sieben Einzelstanzen, wovon sechs kreisförmig um eine Mittelstanze angebracht sind. Auf dem Objektträger wurden zwei sich gegenüberstehende Löcher genau bei 12 und 6 Uhr platziert. Dies erleichterte später das Identifizieren des Lochinhaltes nach Schema wesentlich. Auf jeden Objektträger passten maximal drei Lochrosetten. Diese wurden immer auf dieselbe Art und Weise, und alle immer in derselben Konstellation auf die Träger gestanzt. Anschliessend wurden diese Stanzmarkierungen mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette ausgehoben. Das Absaugen der einzelnen Löcher gewährleistete eine exakt glattrandige Begrenzung der Serumbehälter zum umgebenden Agar. Schliesst man die Wasserstrahlpumpe direkt an die Stanze an (welches möglich ist), um alle Serumbehälter gleichzeitig ausheben zu können, läuft man Gefahr, die gesamte Agargelschicht abzuheben.

Nachdem die Serumbehälter ausgehoben waren, erfolgte das Einfüllen mit dem jeweiligen Serum. Feine Kapillarpipetten kamen zur Anwendung. Diese wurden aus Kapillarröhrchen hergestellt. Sie wurden über dem Bunsenbrenner in der Mitte angeschmolzen und dann zügig an beiden Enden auseinandergezogen. Aus einem Röhrchen entstanden dadurch zwei Kapillarpipetten mit sehr feinen Pipettenspitzen. Diese Pipetten erlaubten leichtes Arbeiten

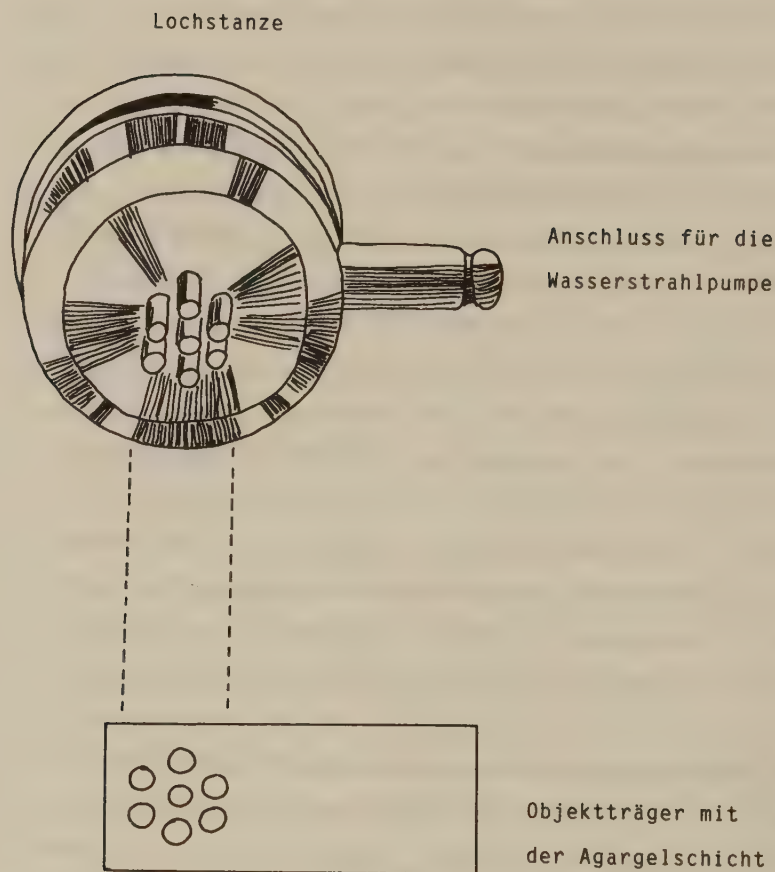


Abb. 8

Mit der abgebildeten Stanze konnte man im Agargel eines Objektträgers drei rosettenförmige Anordnungen von Serumlöchern (Lochdurchmesser: 6 mm, Mittelpunktabstand der peripheren Löcher: 11 mm) ausstanzen.

mit den kleinsten Mengen. Der Serumfluss aus dem Kapillarröhrchen in den Serumbehälter (Stanzloch) war, mit etwas vorheriger Übung, gut beherrschbar. Für jeden neuen Füllmoment wurde eine neue, saubere Kapillare verwendet, um Verwechslungen oder Irrtümer hundertprozentig ausschliessen zu können. Es war besonders darauf zu achten, dass die Seren bis zum oberen Rand eingefüllt wurden. Damit erhielt man zur Diffusion eine ausreichende und konstante Konzentration der Seren. Das Ausschlaggebende bei diesem Arbeitsgang war, den Moment genau abzapassen, wenn die Grenzlinie des Behälters, die man als feine, scharfe Linie sehen konnte, verschwand.

Die beschickten und fertigen Objektträger kamen anschliessend zur Inkubation in feuchte Kammern. Diese bestanden aus rechteckigen, mit einem Deckel verschliessbaren Plastikdosen, auf deren Boden sich eine angefeuchtete, 0,5 cm dicke Schaumgummiunterlage befand. Hierdurch war eine ausreichende Feuchtigkeit gewährleistet.

Die mit Serum beschickten Agarplatten wurden in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur zur Diffusion belassen. Das Ablesen erfolgte nach 24 und nach 48 Stunden bei ausreichendem und nichtblendendem Licht. Zur Hilfe wurde eine schwarze, matte, nichtspiegelnde

Unterlage, sowie eine Tischlupe mit sechsfache Vergrößerung herangezogen. Jedes Reaktionsergebnis wurde schriftlich festgehalten. Mittels eines vorher festgelegten Kennzeichnungsschemas gelang eine eindeutige und vollständige Dokumentation.

Alle Versuche wurden grundsätzlich mit unverdünnten und mit 1:10 ff verdünnten Seren angesetzt. Um die Ergebnisse genau zu überprüfen, besonders die des Untersuchungsmaterials aus dem Sektionsgut, wurde auch jeder einzelne Versuch zweimal wiederholt, also insgesamt dreimal durchgeführt.

4 Antiseren

Artspezifische Anti-Sera zur Proteindifferenzierung für forensische Zwecke von der Firma E. Behring in Marburg:

Anti-Mensch	Anti-Huhn
Anti-Rind	Anti-Schaf
Anti-Schwein	

(Alle Seren stammten vom Kaninchen)

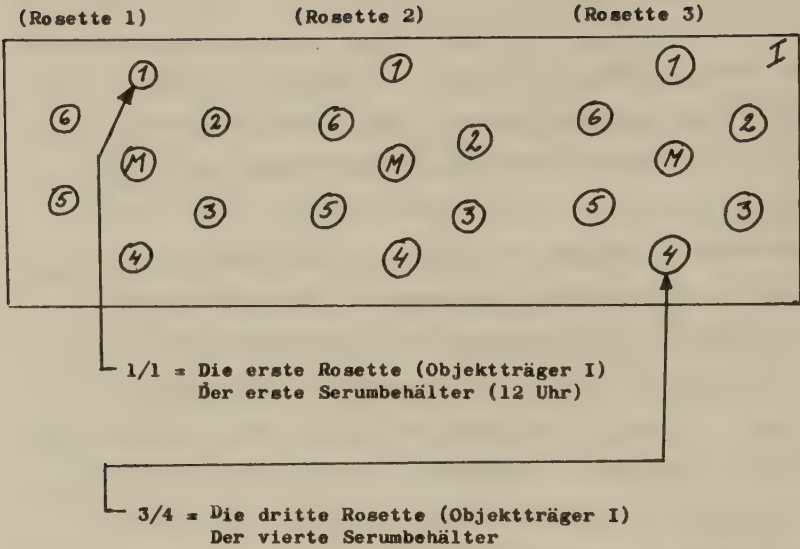
Reagenzien zum immunologischen Nachweis von tierischen und pflanzlichen Proteinen (Protein-Zusätze in Lebensmitteln) von der Firma E. Behring in Marburg:

Antiserum gegen Hühner-Eialbumin
(vom Kaninchen)

5 Protokollschema

Das Protokollschema war gleich am Anfang festgelegt worden und gewährleistete eine rationelle und übersichtliche Protokollführung. Es gestaltete sich nach folgendem Prinzip: Jeder Objektträger wurde mit einer römischen Ziffer und dem Datum des Versuchsansatzes gekennzeichnet. Beginnend mit Objektträger Nr. I wurden alle Stanzrosetten mit arabischen Zahlen durchnummeriert. Träger I enthielt also die Rosetten 1 bis 3, Träger II die Rosetten 4 bis 6 usw. Die sechs peripheren Serumbehälter jeder Rosette erhielten die Ziffern 1 bis 6, im Uhrzeigersinn bei 12 beginnend. Der mittlere Serumbehälter bekam den Buchstaben M als Bezeichnung. (38) Jeder Behälter konnte mittels dieser zwei durch einen Schrägstrich getrennten Ziffern schnell und leicht identifiziert werden. Die erste Ziffer bezeichnete die Rosette, die zweite Ziffer den Behälter. So konnte auch leicht festgehalten werden, welches Serum in welchen Behälter pipettiert worden war. In Abb. 9 wird dargestellt, wie die Protokollbezeichnungen zustandekamen. Beim Füllen der Stanzlöcher aus dem Objektträger wurden grundsätzlich zwei Prinzipien eingehalten. Erstens: Das Mittelloch jeder Rosette erhielt immer nur Antiserum. Zweitens: Jede Rosette bekam eins der peripheren Löcher mit Aqua dest. gefüllt, welches als Negativkontrolle diente.

Objektträger I:



Objektträger II:

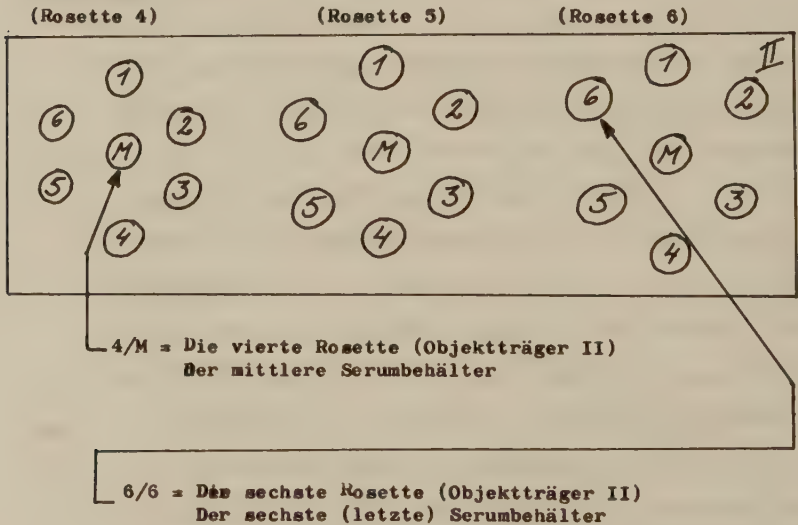


Abb. 9

Das Protokollschema.

V ERGEBNISSE

Erste Vorversuche mit gekauftem Schweine- und Rindfleisch gaben unterschiedliche Ergebnisse. (Tab. 1 und 2) Von den Rohfleischproben (Proben Nr. 1-6, Tab. 1), jeweils dreimal Schweinefleisch und dreimal Rindfleisch, ergaben sich eindeutig positive Ergebnisse mit entsprechendem Antiserum, sowohl bei der Extraktion 1 g auf 9 ml als auch 1 g auf 4 ml 0,9%ige NaCl-Lösung. Bei insgesamt dreimaliger Durchführung der Versuchsansätze konnte also ganz klar festgestellt werden, dass rohes Schweinefleisch mit dem Antiserum gegen Schwein positiv reagierte. Entsprechende Ergebnisse zeigten sich analog mit rohem Rindfleisch, welches mit dem Antiserum gegen Rind reagierte. Diese Proben waren eindeutig negativ mit den restlichen Seren.

Die Proben Nr. 7-12 zeigten überhaupt keine Präzipitationslinien, obwohl auch hier Tripelbestimmungen gemacht wurden. Sie waren vorher etwa eine Stunde lang in etwas Aqua dest. in getrennten Gefäßen gekocht worden. Weder bei den gekochten Schweinefleischproben (Tab. 1, Proben Nr. 7-9) noch bei den entsprechenden Rindfleischproben (Tab. 1, Nr. 10-12) konnten irgendwelche Präzipitationerscheinungen gegen eins der sechs verschiedenen Antiseren beobachtet werden. Trotz dieser ersten negativen Ergebnisse wurde der Untersuchungsmodus weiterhin bei

PROBE	ROHES	EXTRAKTIONS - ANSÄTZE MIT NaCl - LÖSUNG, 0,9 %											
NR.	MATERIAL:	1 g auf 9 ml Lsg.						1 g auf 4 ml Lsg.					
		ME	RI	SW	HU	SF	EI	ME	RI	SW	HU	SF	EI
1	Schweinefleisch	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0
2	Schweinefleisch	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0
3	Schweinefleisch	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0
4	Rindfleisch	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
5	Rindfleisch	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Rindfleisch	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GEKOCHTES												
	MATERIAL:												
7	Schweinefleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Schweinefleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Schweinefleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Rindfleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Rindfleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Rindfleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 1

Einzelergebnisse des Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony mit dem Material, welches nicht dem Sektionsgut entstammte und welches jeweils gegen sechs verschiedene Antiseren und in zwei verschiedenen Verdünnungen getestet wurde. (ME=Antiserum gegen Mensch, RI=Antiserum gegen Rind, SW=Antiserum gegen Schwein, HU=Antiserum gegen Huhn, SF=Antiserum gegen Schaf, EI=Antiserum gegen Hühner-Eialbumin)

UNTERSUCHTES MATERIAL:	ANTI-RIND		ANTI-SCHWEIN	
	positiv:	negativ:	positiv:	negativ:
Schweinefleisch				
roh	0	3	3	0
Schweinefleisch				
gekocht	0	3	0	3
Rindfleisch				
roh	3	0	0	3
Rindfleisch				
gekocht	0	3	0	3

Tab. 2

Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse der Tabelle 1.

den Proben aus dem Sektionsgut beibehalten, da die Ergebnisse mit den Rohfleischproben ganz eindeutig positiv waren und sich problemlos reproduzieren liessen.

Die grösste Probengruppe machte das Material aus, welches aus dem Sektionsgut stammte. (Tab. 3) Es war nie vorher exakt feststellbar, um welches Material es sich genau handelte. Obwohl man sich ausschliesslich auf die Differenzierung unter Sicht des blossen Auges verlassen musste, ergaben sich eindeutig drei Hauptgruppen. Zweimal konnten Eireste gewonnen werden und elfmal handelte es sich um Material aus Wurstresten. Die grösste

PROBE NR.	SEKTIONS- MATERIAL	EXTRAKTIONS - ANSÄTZE MIT NaCl - LÖSUNG, 0,9 %											
		1 g auf 9 ml Lsg.						1 g auf 4 ml Lsg.					
		ME	RI	SW	HU	SF	EI	ME	RI	SW	HU	SF	EI
13	Ei	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+
14	Ei	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
15	Wurst	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
16	Wurst	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
17	Wurst	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
18	Wurst	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
19	Wurst	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+
20	Wurst	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+
21	Wurst	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
22	Wurst	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
23	Wurst	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
24	Wurst	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
25	Wurst	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+
26	Fleisch	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
27	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	Fleisch	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
30	Fleisch	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
31	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	Fleisch	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
35	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	Fleisch	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
40	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	Fleisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 3

Einzelergebnisse des Doppeldiffusionsverfahrens nach Ouchterlony mit dem gesamten Sektionsmaterial.

Gruppe beinhaltete 17 Fleischproben, wobei nicht festgestellt werden konnte, um welche Fleischart es sich genau handelte. Weder die makroskopische Sichtung noch Polizeiprotokolle gaben darüber Aufschluss.

Bei dem Eimaterial (Tab. 4) reagierten beide Proben positiv mit dem Anti-Hühner-Eialbumin-Serum. Es bildeten sich schmale und scharfe Präzipitationsbande aus. Zusätzlich reagierte die Eiprobe Nr. 13 noch positiv mit dem Anti-Mensch-Serum. Bei den elf Wurstproben (Tab. 5) reagierten sämtliche ausser zweien eindeutig positiv mit dem Antiserum gegen Hühner-Eialbumin. Diese neun Proben zeigten immer das gleiche Ergebnis bei den dreimaligen Bestimmungen von den jeweils zwei verschiedenen Extraktionsansätzen. Vier der Wurstproben reagierten positiv in den Ansätzen gegen Anti-Mensch-Serum. Von diesen vier zeigten zwei gleichzeitig positive Reaktion mit dem Serum gegen Hühner-Eialbumin (Tab. 3, proben Nr. 19 und 20). Bei den restlichen Typen von Antiseren wurde kein einziges Mal eine Präzipitationsbande beobachtet.

Die grösste Gruppe der Sektionsgutproben waren als Fleisch oder Fleischreste vorab identifiziert worden. Dabei war nie festzustellen, um welches Fleisch es sich handelte, d.h. von welcher Spezies es entstammte. Zweifellos konnte trotzdem ganz eindeutig mit dem

EI-MATERIAL		
ANTISEREN:	POSITIV:	NEGATIV:
Anti-Mensch	1	1
Anti-Rind	0	2
Anti-Schwein	0	2
Anti-Huhn	0	2
Anti-Schaf	0	2
Anti-Hühner-	2	0
Eialbumin		

Tab. 4

Ergebnisse des Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony mit den zwei Ei-Proben, (aus dem Sektionsgut) die gegen sechs verschiedene Anti-Sera ausgetestet wurden. Das Material wurde vorher in zwei verschiedenen Verdünnungen von 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert.

blossen Auge festgestellt werden, dass es sich um Fleisch handelte. Von diesen insgesamt siebzehn Proben, die aus den Mägen siebzehn verschiedener Leichen entnommen worden waren, reagierten nur fünf überhaupt positiv und zwar in den Ansätzen gegen Anti-Mensch-Serum.(Tab. 6) Die Ansätze mit den anderen fünf Anti-Seren ergaben eindeutig

WURST-MATERIAL

ANTISEREN:	POSITIV:	NEGATIV:
Anti-Mensch	4	7
Anti-Rind	0	11
Anti-Schwein	0	11
Anti-Huhn	0	11
Anti-Schaf	0	11
Anti-Hühner- Eialbumin	9	2

Tab. 5

Ergebnisse des Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony mit den elf Wurstproben aus dem Sektionsgut. Das Material wurde in zwei verschiedenen Verdünnungen von 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert und gegen sechs verschiedene Antiseren ausgetestet.

FLEISCH-PROBEN

ANTISEREN:	POSITIV:	NEGATIV:
Anti-Mensch	5	12
Anti-Rind	0	17
Anti-Schwein	0	17
Anti-Huhn	0	17
Anti-Schaf	0	17
Anti-Hühner- Eialbumin	0	17

Tab. 6

Ergebnisse des Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony mit den siebzehn Fleischproben aus dem Sektionsgut. Das Material wurde in zwei verschiedenen Verdünnungen von 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert und gegen sechs verschiedene Antiseren ausgetestet.

negative Ergebnisse. Die restlichen zwölf Proben zeigten ein eindeutig negatives Ergebnis mit allen sechs verschiedenen Antiseren.

Der zweite Abschnitt der Untersuchung war eine Versuchsreihe mit 5%iger Ammoniaklösung als Extraktionsmittel. Dieses Mittel greift die antigenen Strukturen nicht an.

(37) Die ersten Versuche wurden mit den gekauften Rind- und Schweinefleischproben gemacht. Analog zu den Versuchen mit 0,9%iger NaCl-Lösung waren auch hier sechs Proben gekocht und sechs ungekocht. Somit ergaben sich wieder vier Untergruppen (Tab. 7 und 8). Auch hier konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden, weder bei den Homogenisationsansätzen 1 g Probe auf 4 ml Extraktionslösung noch bei den Ansätzen 1 g Probe auf 9 ml Extraktionslösung. Es wurden immer Tripelbestimmungen durchgeführt, jedoch bildeten sich in keinem Falle Präzipitationsbanden aus.

Obwohl die gerade beschriebenen Versuche immer negativ ausgefallen waren, wurden dieselben Versuchsansätze auch mit drei aus dem Wurstmateriel des Sektionsgutes stammenden Proben durchgeführt. Auch hier bildeten sich keine Präzipitate aus. Alle Proben waren immer negativ in den sechs Ansätzen gegen die verschiedenen Antiseren, auch gegen Anti-Hühner-Eialbumin (Tab. 9).

ANTISEREN	ROHES SCHWEINEFLEISCH		ROHES RINDFLEISCH	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Anti-Mensch	0	3	0	3
Anti-Rind	0	3	0	3
Anti-Schwein	0	3	0	3
Anti-Huhn	0	3	0	3
Anti-Schaf	0	3	0	3
Anti-Hühner- Eialbumin	0	3	0	3

Tab. 7

Ergebnisse des Doppeldiffusionsverfahrens nach Ouchterlony mit den sechs gekauften Rohfleischproben, welche in zwei verschiedenen Verdünnungen von 5%iger Ammoniaklösung extrahiert und gegen sechs verschiedene Antiseren ausgetestet worden waren.

ANTISEREN	GEKOCHTES SCHWEINEFLEISCH		GEKOCHTES RINDFLEISCH	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Anti-Mensch	0	3	0	3
Anti-Rind	0	3	0	3
Anti-Schwein	0	3	0	3
Anti-Huhn	0	3	0	3
Anti-Schaf	0	3	0	3
Anti-Hühner- Eialbumin	0	3	0	3

Tab. 8

Ergebnisse des Doppeldiffusionsverfahrens nach Ouchterlony analog zu Tab. 7, aber statt roher, wurden gekochte Fleischproben verwendet.

WURSTMATERIAL IN AMMONIAKLÖSUNG EXTRAHIERT

ANTISEREN:	POSITIV	NEGATIV
Anti-Mensch	0	3
Anti-Rind	0	3
Anti-Schwein	0	3
Anti-Huhn	0	3
Anti-Schaf	0	3
Anti-Hühner- Eialbumin	0	3

Tab. 9

Ergebnisse des Doppeldiffusionsverfahrens nach Ouchterlony mit den drei Wurstproben aus dem Sektionsgut, welche in zwei verschiedenen Verdünnungen von 5%iger Ammoniaklösung extrahiert und gegen sechs verschiedene Antiseren ausgetestet worden waren. Das ursprüngliche Material dieser drei Proben ist identisch mit dem jeweiligen Material der Proben Nr. 23, 24 und 25.

FLEISCHMATERIAL IN AMMONIAKLÖSUNG EXTRAHIERT

ANTISEREN:	POSITIV	NEGATIV
Anti-Mensch	0	4
Anti-Rind	0	4
Anti-Schwein	0	4
Anti-Huhn	0	4
Anti-Schaf	0	4
Anti-Hühner- eialbumin	0	4

Tab. 10

Ergebnisse des Doppeldiffusionsverfahrens nach Ouchterlony mit den vier Fleischproben aus dem Sektionsgut, welche in zwei verschiedenen Verdünnungen von 5%iger Ammoniaklösung extrahiert und gegen sechs verschiedene Antiseren ausgetestet worden waren. Das ursprüngliche Sektionsmaterial dieser vier Proben ist jeweils identisch mit dem Material der Proben Nr. 26, 27, 28 und 29.

Abschliessend wurde analog noch ein Versuch mit vier aus dem Fleischmaterial des Sektionsgutes stammenden Proben gemacht. Es wurden wieder zwei verschiedene Homogenisations-Extraktions-Ansätze und Tripelbestimmungen durchgeführt. Auch bei diesen vier verschiedenen Proben erschien kein einziges Mal ein Präzipitat (Tab. 10).

VI DISKUSSION

OEPEN (24) stellte in ihren Untersuchungen 1972 fest, dass die quergestreifte Muskulatur von den verschiedenen, untersuchten Gewebearten sich am besten aufbereiten lässt und die besten Resultate bei den AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmungen liefert. Die Muskulatur ist auch am wenigsten anfällig für Fäulnisprozesse. Das Material der vorliegenden Untersuchung eignet sich durchaus für die gestellte Zielsetzung.

Die Problematik beginnt aber mit dem denaturierten Material, welches auch die Vergleichsreihe von gekochtem und rohem Fleisch aus dem Handel zeigt. Nur die Rohfleischproben reagierten positiv mit dem entsprechenden Antiserum. HAUROWITZ (12) macht das serologische, positive Ergebnis davon abhängig wie die Aktivität der determinanten Gruppen des hitzedenaturierten Materials ist. So stellte KOTTER (17) fest, dass die serologische Bestimmung der Proteine einer bestimmten Tierart auch im bearbeiteten Material keine Schwierigkeiten macht,

solange dieses nicht erhitzt worden ist. Beim Erhitzen erfahren die Eiweisskörper tiefgreifende Strukturveränderungen, die durch Einwirkung bestimmter "Energien" die Unbrauchbarkeit für eine serologische Reaktion bedingen können. Nach FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ (1951) beeinflusst die Denaturierung nicht nur die Kristallisierbarkeit und die Viskosität, Diffusions- und Sedimentationskonstanten, sondern auch die serologische Spezifität. Diese intramolekularen Änderungen sind die Hauptmerkmale der Denaturierung von Eiweissen nach NEURATH und Mitarbeiter (1942). Dies ist durch röntgenanalytische Untersuchungen von ASTBERG (1933), PERUTZ (1951) und SANGER erhärtet worden (zit. KOTTER 17).

Das Agargel nach Hirschfeld, welches hier verwendet wurde, scheint gut geeignet zu sein. TRÖGER (38) stellte fest, dass das Hirschfeld-Agargel die am besten ausgebildeten und schärfsten Präzipitationslinien aufweist. So wurden hier die Kriterien, welche OUCHTERLONY (26) verlangt, zur Spezifität der Präzipitate angelegt. Die Präzipitationslinien sollten reproduzierbar, fein und sichelförmig ausgebildet und die dazu verwendeten Antiseren unauffällig sein. Die Proben wurden zweimal, nach 24 und 48 Stunden, abgelesen, welches aber keine unterschiedlichen Ergebnisse brachte. Die aufgetretenen Präzipitationsbanden waren schon nach 24 Stunden voll ausgebildet. Nach WITTMANN (44) sind später als 24 Stunden auftretende Präzipitationsbanden als unspezifisch

anzusehen.

Bei der Probenaufbereitung wurde nur physiologische Kochsalzlösung als Extraktionsmittel verwendet, ausgenommen die Reihe von insgesamt 19 Proben, welche zusätzlich mit 5%iger Ammoniaklösung extrahiert wurden. Diese Versuchsansätze fielen gänzlich negativ aus. KIND et al. (zit. TRÖGER 37) hatten 1969 berichtet, dass mit einer 5%igen Ammoniaklösung eine schnelle Extraktion ohne Zerstörung der antigenen Struktur möglich ist. Es handelte sich jedoch hierbei um Blutspuren. Mangels ausreichender Mengen an Untersuchungsmaterial aus dem Sektionsgut blieb diese Ammoniak-Reihe in ihrem Umfang sehr begrenzt. SINELL (34) empfiehlt ein anderes Aufbereitungsverfahren in Anlehnung an ADOLF (1923), SPIEGEL-ADOLF (1926), ANSON und MIRSKY (1931). Dabei wird das Material mit Petroläther entfettet, dann homogenisiert, lyophilisiert, anschliessend in Aqua dest., 0,9%iger NaCl-Lösung und in 0,01 n-Natronlauge verrieben. Er konnte mit dieser Aufbereitungsmethode Verfälschungen in Material, welches bis +105°C erhitzt worden war (Dosenwürstchen) und in Vollkonserven wie z.B. Dosengulasch, Corned Beef und Rouladen, serologisch nachweisen.

OEPEN (24) stellt fest, dass ungewaschenes Gewebsextrakt eine geringere Fehlerquote aufweist als gewaschenes Material. In dieser Untersuchung wurden sämtliche

Proben mit Aqua dest. ausgewaschen. KOTTER (17) meint allerdings, dass das Problem bei einer biologischen Eiweissdifferenzierung von erhitztem Fleisch- und Wurstmaterial nicht in einer mangelnden Reaktionsfähigkeit begründet ist, sondern in der Schwierigkeit, hitze-koaguliertes Eiweiss bei Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung in Lösung zu bringen. Zur besseren Löslichkeit empfiehlt er eine Alkali-Essigsäure-Extraktion und eine Lyophilisation.

Die hier verwendeten Antiseren wurden alle von der Behring AG bezogen und eignen sich zur Differenzierung von Fleisch, Blut und sonstigen serumproteinhaltigen Substanzen menschlicher und tierischer Herkunft. (7)

Allerdings wird hier vom Hersteller die Röhrchen-Methode mit dem flüssigen Medium empfohlen. Alle Seren wurden vom Kaninchen gewonnen, welches nach MULLER (22) das geeigneteste Versuchstier zu diesem Zwecke ist. Die Schwierigkeit liegt wohl u.a. darin, dass die Seren mittels Nativmaterial-impfung gewonnen wurden. So schreibt SINELL (34), dass die serologische Identifikation von erhitztem Material misslingt, wenn Seren verwendet werden, die mit nativen Antigenen gewonnen wurden. Doch lässt sich auch eine Immunisierung mit teilweise hitzedenaturierten Muskelproteinen durchführen. SCHLEYER und OEPEN (31) weisen besonders auf die mit hitzedenaturiertem Serumeiweiss und Hämoglobin (sog.

"Koktoantigene") erzeugten Immunseren hin. Diese sollen auch hitzedenaturiertes Protein identifizieren. Derartige Antiseren standen uns leider nicht zur Verfügung. Ausgenommen hiervon ist allerdings das Anti-Hühnerei-Albumin-Serum, welches mit Ei- und Wurstproben positive Resultate lieferte. Dieses Serum war durch eine Mischung von "intakten" Handelspräparaten und hitze-behandelten, denaturierten Antigenen gewonnen worden. (8)

HEIMANN (13) weist darauf hin, dass die Präzipitationsmethode ungeeignet ist, wenn es darum geht, denaturiertes Eiweiss oder erhitztes Fleisch zu untersuchen. Die Untersuchungen von PRZYBYLKIEVICZ aus dem Jahre 1936 (28) werten die Methode als unbrauchbar, wenn es darum geht, die Artspezifität der Proteinreste aus dem Verdauungstrakt nachzuweisen. Er verwendete allerdings Kot als Versuchsmaterial. - BACKHAUSZ (1) bezeichnet die auf der radialen Doppeldiffusion beruhende Auswertung als weder präzise noch besonders empfindlich. Dagegen sprechen die Erfahrungen von MADIWALE und MAHAL (19), welche besagen, dass falsch positive Reaktionen nur gelegentlich bei einfachen Präzipitationsversuchen in flüssigen Medien auftreten, jedoch nie bei der Gel-diffusion. Dieselben Autoren (20) beobachteten auch, dass falsch negative Reaktionen eher im flüssigen Medium als im Gel zu erwarten seien. Nach SCHEIBNER (30) ist die Methode nach Ouchterlony sehr zuverlässig und besonders empfindlich. SINELL (34) bezeichnet sie als besser

geeignet als andere Methoden, wo ein flüssiges Medium verwendet wird, ganz besonders dann, wenn natives Material untersucht wird. Jüngste Untersuchungen mit milch- und käsehaltigem Untersuchungsmaterial aus der Sektion (23) haben gezeigt, dass die Technik nach Ouchterlony für die Proteindifferenzierung von Mageninhalt durchaus geeignet ist. Die Proben zeigten positive Ergebnisse mit Rindermolke-Antiserum und mit Casein-Antiserum. Jedoch bieten Milchprodukte die Besonderheit, dass die spezifischen Antigene durch Kochen nicht so beeinträchtigt werden wie andere Proteine. (34)

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen bei den zwölf Proben aus dem Handel das erwartungsgemäße, positive Resultat mit dem Nativmaterial. Dass die gekochten Proben aus dieser Gruppe keine Präzipitationsbanden aufweisen, ist sicherlich auf die Strukturveränderungen der antigenen Determinanten bei der Denaturierung zurückzuführen. Untersuchungen von SIMEONI (32) zeigten ähnliche, negative Ergebnisse bei 100 Sektionsproben aus dem Darm. Jedoch wurden auch, wie in vorliegender Untersuchung, positive Ergebnisse mit dem Anti-Mensch-Serum festgestellt. Diese positiven Reaktionen waren nur bei Sektionsproben und nicht bei den Proben Lebender festgestellt worden. Bei der hier vorliegenden Untersuchung zeigen zehn von insgesamt 30 Proben positive Reaktionen mit dem Anti-Mensch-Serum. Sie sind als Ausdruck postmortalen

Veränderungen im Magen-Darm-Trakt anzusehen. SINAPIUS (35) stellt fest, dass eine Ablösung und Dissoziation der Endothelien von Gefässen schon sechs Stunden nach dem Tod auftreten können. BAKULEV (2) äussert, dass das Serum post mortem durch Diffusion in den Verdauungstrakt gelangt. Ausserdem enthält der Magen-Darm-Trakt schon rein physiologisch neben Elektrolyten und Lipiden vor allem Proteine und zwar Albumin, Gamma-Globulin, Glykoproteide und Enzyme. (42) Die positiven Ergebnisse mit Anti-Hühner-Eialbumin-Serum bei den Wurstproben sind zwanglos zurückzuführen auf die heute weit verbreitete Verarbeitungsart in der Lebensmittelindustrie bei Würsten, Hühnereiweiss dazuzufügen. (33)

Abschliessend kann die Feststellung getroffen werden, dass Nahrungsmittelleiweiss im Mageninhalt nachweisbar ist. Zu diesem Zweck ist die Methode nach Ouchterlony geeignet, obwohl in dieser Arbeit eine Differenzierung zwischen Wurst und Ei einerseits bzw. Fleisch andererseits nicht gelang. Dies gilt besonders im Hinblick darauf, dass Fleischproben niemals gegen Hühner-Eialbumin-Antiserum positiv reagierten.

VII ZUSAMMENFASSUNG

Der Mageninhalt 30 Verstorbener wurde, nachdem unter Sicht des Auges zwischen tierischen und pflanzlichen Bestandteilen differenziert wurde, untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Unterscheidung zwischen Wurst- und Eiresten einerseits sowie Fleischteilen andererseits. Von diesen Nahrungsmitteln wurde 1 g Probe mit 4 ml bzw. 9 ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert, in sieben Fällen zusätzlich mit 5%iger Ammoniaklösung jeweils mit 4 ml bzw. 9 ml. Nach 24 stündiger Extraktion bei + 4°C erfolgten die Untersuchungen im Doppeldiffusionsverfahren nach Ouchterlony. Die Proben wurden gegen die artspezifischen Antiseren der Firma E. Behring geprüft und zwar gegen: Anti-Mensch, Anti-Rind, Anti-Schwein, Anti-Huhn und Anti-Hühnereier-Albumin. Analoge Vorversuche wurden mit 12 Proben aus dem Handel durchgeführt. Es handelte sich dabei um sechs Proben vom Schwein, jeweils drei rohe und drei gekochte, und sechs Proben vom Rind, ebenfalls drei rohe und drei gekochte.

Beim Ablesen nach 24 und 48 Stunden ergaben sich folgende, an der unverdünnten Probe am deutlichsten ausgeprägte Befunde: Nach Extraktion mit Ammoniaklösung, sowohl in den zwölf Vorversuchsproben als auch in den sieben Sektionsgutproben, zeigten sich in allen Fällen keine Präzipitationsbänder. Wurde Fleisch aus dem Sektionsgut mit physiologischer NaCl-Lösung extrahiert (17 Fälle),

konnte eine Artspezifizierung nicht erfolgen. Hiervon zeigten fünf Fälle eine positive Reaktion mit Anti-Mensch-Serum. Bei neun Wurst- und zwei Ei-proben konnte unabhängig von der Kochsalzmenge eine positive Reaktion gegen Hühnereier-Albumin festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt sich zwanglos durch das bekanntermassen bei der Herstellung von Würsten verwandte Eiereiweiss erklären.

Es gelang also die Identifizierung von Hühnereiweiss im Mageninhalt mittels der Ouchterlony-Technik und mittels der uns zur Verfügung stehenden Antiseren. Zusätzlich konnte zwischen Wurst- und Fleischresten differenziert werden. Die artspezifische Unterscheidung der Fleischreste gelang jedoch nicht.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 1 BACKHAUSZ, R. Immunodiffusion und Immunelektrophorese, Grundlagen, Methoden und Ergebnisse. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, (1967)
- 2 BAKULEV, S.N. Blood changes in the area of the livors spots in violent and sudden death, "Über Veränderungen des Blutes im Bereich der Totenflecken bei gewaltsamen und plötzlichen Todesfällen", Sudebnomed. eksp. (Moskau) 9, Nr 3, 3-6 (1966), (Russisch) zit. nach Ref. in Z. gerichtl. Med., 60, 330-331, (1967)
- 3 BAUDNER, S. Analysis of Plant proteins using immunological techniques based on the antigen-antibody precipitation Ann. Nutr. Alim. 31, 165-178, (1977)
- 4 BAUR C., SPANN K.W., TRÖGER H.D., SCHULLER E. Magenfüllung und Todeszeitpunkt Beitr. z. Gerichtl. Med., 38, 193-196 (1980)
- 5 BECHHOLD, H. Strukturbildung in Gallerten Z. Phys. Chem., 52, 185 (1905)
- 6 BELJAARS P., OLSMAN I. Collaborative Study on the detection of caseinate and soya protein isolate in meat products Ann. Nutr. Alim., 31, 233-244, (1977)
- 7 BEHRING INSTITUT Artspezifische Antisera präzipitierend für die biologische Eiweissdifferentierung Behringwerke AG, Marburg, (1979)
- 8 BEHRING INSTITUT Reagenzien zum immunologischen Nachweis von tierischen und pflanzlichen Proteinen Behringwerke AG, Marburg, (1980)

- 9 ELEK, S. D. Analysis of complex flocculation systems
by means of diffusion gradients
Brit. J. Exp. Pathol., 30, 484, (1949)
- 10 GROSSKLAUS, D. Untersuchungen zum histologischen Nachweis
von Verfälschungen bei Krustentierkonserven
Arch. Lebensmittelhygiene, 15, 6-8, (1964)
- 11 HARTMANN, H. Gerichtlich-medizinische Möglichkeiten
der Leichenidentifikation
Kriminalistik, 25, 377-379, (1971)
- 12 HAUROWITZ, F. Biosynthese der Proteine und ihre Beein-
flussung durch Antigene
Verh. Ges. Dt. Naturf. Ärzte, 1959, 142-147
- 13 HEIMANN, W. Grundzüge der Lebensmittelchemie
Dr. D. Steinkopff Verlag, Darmstadt, (1976)
- 14 HOLCZABEK, W. Zur Untersuchung des Magen-Darm-Traktes
für die Todeszeitbestimmung
Beitr. Gerichtl. Med., 21, 23-27, (1961)
- 15 KORNGOLLD, L., The effect of the antigens molecular weight
VAN LEEUWEN G. on the curvature of the precipitin line in
the Ouchterlony technic
J. Immunol., 78, 172, (1957)
- 16 KOTTER, L. Serologische methoden zur Untersuchung
von Proteinen
in Schormüller J.
Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. II,
2. Teil, Springer Verl., Berlin, Heidelberg,
New York, (1967)
- 17 KOTTER, L. in L. ACKER: Handbuch der Lebensmittelchemie,
Bd. II, Teil 2, 211 ff.
Springer Verlag, (1968)

- 18 LÖFFLER G., PETRIDES P.E., Physiologische Chemie
WEISS L., HARPER H.A. Springer Verlag (1979)
- 19 MADIWALE M.S., MAHAL H.S. Schwierigkeiten beim Nachweis der Artzugehörigkeit an zersetzten Blutflecken
Arch. Kriminol., 146, 18-25, (1970)
- 20 MADIWALE M.S., MAHAL H.S. Zur Bestimmung der Artzugehörigkeit von Blutflecken bei forensischen Untersuchungen
Arch. Kriminol., 143, 87-95, (1969)
- 21 MERKEL, H. Über Mageninhalt und Todeszeit
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 1, 346-358, (1922)
- 22 MULLER M., FONTAINE G., Identification of Human Haemoglobin by an
MULLER P., GOURGUECHON Immunological Method
Med. Sci. Law, 1, 378, (1961)
- 23 NEUMAIR, J. Untersuchungen zum Nachweis von Milch bzw. Käse in Mageninhalten mittels des Doppel-diffusionsverfahrens nach Ouchterlony
Med. Diss., München, (1983)
- 24 OEPEN, I. AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmung an Haut, Muskulatur, Milz und Niere zur Identifizierung von Leichenteilen
Institut für Rechtsmedizin d. Univ. Marburg, (1972)
- 25 OUCHTERLONY, Ö. Antigen-Antibody-Reaction in Gels
Acta Path. mikrobiol. Scand., 26, 507-515, (1949)
- 26 OUCHTERLONY, Ö. Diffusion in gel
Progr. Allergy, 5, (1958)

- 36 SPANN, K.W. Zur Untersuchung der pflanzlichen Bestand-
teile des Mageninhaltes
Z. Rechtsmed., 82, 129-135, (1978)
- 37 TRÖGER, H.D. Ein modifiziertes Absorptions-Elutions-
Verfahren zur Schnell-Bestimmung der
ABO-Gruppe an Blutspuren
Beitr. z. Gerichtl. Med., 30, 445-448, (1973)
- 38 TRÖGER, H.D. Menschliche Isoimmunpräzipitation,
Untersuchungen über Serumgruppen und
erblichen Polymorphismus im Lipoprotein-
bereich
Med. Diss., München, (1970)
- 39 UHLENHUTH, P. Über die Entwicklung der biologischen
Eiweisssdifferenzierungsverfahren
Dtsch. Z. gerichtl. Med., 39, 309, (1948)
- 40 UHLENHUTH P., WEIDANZ O. Praktische Anleitung zur Ausführung des
biologischen Eiweisssdifferenzierungsver-
fahrens mit besonderer Berücksichtigung
der forensischen Blut- und Fleischunter-
suchungen sowie der Gewinnung von
präzipitierenden Sera.
Gustav Fischer Verlag, Jena, (1909)
- 41 VAN OSS C.J., HECK Y.S.L. A qualitative and quantitative inter-
pretation of double diffusion
Z. Immunforschung, 122, 44, (1962)
- 42 WALDECK, F. Funktionen des Magen-Darm-Kanals in:
Physiologie des Menschen von:
SCHMIDT R.F., THEWS G.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, (1977)

- 43 WATSON, J.D. Molekulare Biologie des Gens
Intereurop. Ed., Amsterdam, (1975)
- 44 WITTMAN, G. Virusspezifische Präzipitation bei der
ansteckenden Schweinelähmung (Teschener
Krankheit) mit Hilfe des Agar-Gel-
Diffusionsverfahrens
Zbl. Vet. Med., 5, 505-514, (1958)

IX LEBENSLAUF

Am 30. Oktober 1955 wurde ich, Peer Rosenkranz, als Sohn des Zahnarztes, Herrn Dr. med. dent. Friedrich Rosenkranz und seiner Ehefrau Renate geb. Bergner in Getinge/Schweden geboren. 1962 wurde ich in der Gamleby-skolan in Varberg/Schweden eingeschult und am 6. Juni 1975 bestand ich den Abschluss des Gymnasiums, dreijährige Naturwissenschaftliche Linie, an der Peder Skrivares Skola in Varberg/Schweden. Das Schuljahr 1971-72 hatte ich als Rotary Stipendiat an der Meadville Area Senior High School in den USA verbracht. Im Wintersemester 1975-76 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität zu München auf. Zum Sommersemester 1983 wechselte ich das Studienfach zur Zahnheilkunde. Im Frühjahr 1984 schloss ich mein Studium der Humanmedizin mit dem dritten Teil der ärztlichen Prüfung erfolgreich ab.

